CHEF Mapper

CHEF DR-Ⅲ

CHEF DR-Ⅱ

アプリケーションマニュアル　ver.1.1



目　次

詳細は英語版取扱説明書またはTechnical Bulletinを参照下さい。
（ご請求下さい）

Bulletin 1589 Preparation and separation of mammalian DNA by PFGE
Bulletin 1624 Cooling module
Bulletin 1637 CHEF Mapper and CHEF Mapper XA system specifications
Bulletin 1647 Electrophoretic Karyotypes of Wine Strains of *S.cerevisiae*
Bulletin 1648 Application of two dimensional PFGE for determining molecular Karyotypes
Bulletin 1659 Extending the upper limits of PFGE using programmed voltage gradient
Bulletin 1736 PFGE analysis of Chromosomal DNA from a Single hair root
Bulletin 1753 Preparation and restriction digestion of *E.Coli* chromosomal DNA in agarose plugs for use in PFGE
Bulletin 1769 Resolution of linear DNA fragments from 23Kb to 6Mb using biphasic linear Switch Time ramping
Bulletin 1796 CHEF DRIII variable angle PFGE system
Bulletin 1584 M785 vacuum blotter
Bulletin 2096 Zeta probe GT membranes

1．サンプル調整

1.1　アガロースブロックとリキッドサンプル

一般的な手順では分子量の大きなDNAを完全に調整することはできません。巨大DNA分子はとても壊れやすく精製の際に物理的に切断されます。DNAが物理的に切断されるのを防ぐため、細胞をアガロース中に包埋したまま溶解し、脱タンパクします。アガロースに包埋することによってDNAが保護されサンプルの扱いが簡便になります。処理されたアガロースプラグDNAは直接泳動ゲルのウェルに挿入し泳動します。バイオ・ラッドではサンプルプラグ作製用のディスポーザブルサンプルプラグモールド（カタログ番号170-3713）をお勧めしております。

次にサンプルの調整法を簡単に述べます。未処理の細胞を濃度調整済のローメルトアガロース（カタログ番号162-0017）と混合します。サンプルはサンプルプラグモールドに入れたままチャンバーに入れて冷やし、モールドから取り出して試薬と酵素に浸し、DNAからすべての細胞構成物を取り除きます。洗浄後、アガロースプラグはアガロースゲルのウェルに合わせて切り、アプライします。

ある程度小さいサイズのDNAは一般的な方法でも調整できます。数百KbのDNAはアガロースで包埋する必要はなく、通常の方法で精製し、液体の状態でウェルにアプライすることが可能です。50-200Kb範囲のDNAを扱う場合はピペットの先を太くして行うことをお勧めします。液体のサンプルを泳動する場合、薄いウェルコーム（0.75mm）のものを用いるとシャープなバンドが得られます。

1.2 *Saccharomyces.cerevisiae* のクロモゾーマルDNAの調整法

次の方法は、Schwartz and Cantor（1986）による方法で、一般的な酵母用のプロトコールです。

1. YPD media（1%Yeast Extract、2%Dextrose、2%Bactopeptone）で酵母細胞を30℃下で36～48時間培養します。
2. 4℃10分3,000rpmで遠心し細胞を集菌します。
3. 0.05M EDTA、pH8.0で細胞のペレットを2回洗浄します。
4. 上清を捨て、細胞と同量の0.05M EDTA、pH8.0で再びサスペンジョンします。
5. 希釈サンプルをヘモサイトメーターまたはカウント用に少量取り、YPDプレートで一晩30℃の条件で培養して細胞の濃度を決定します。
6. 細胞に酵素（Lyticase、Zymoryase等の細胞壁除去用酵素）を混合し適温で20～30分インキュベートします。（酵素の種類に応じた方法で行なって下さい）
7. 0.125M EDTA、pH7.5溶液で1%ローメルト調整用アガロースを調整します。アガロースは電子レンジかホットプレート等で溶解し、45～50℃に冷まします。
8. 細胞混合液をアガロースと同じ温度（45～50℃）に温めます。1～2%の溶解したアガロースを細胞酵素混合液に最終濃度0.75～1%になるように加えます。この段階でアガロース濃度を調整するには0.05M EDTA 、pH8.0を用います。滅菌済の使い捨てのピペットを用いて良くサスペンジョンします。
9. サンプルプラグモールドの中に調整済みアガロースを注入し、サンプルプラグモールドごと4℃、20分程度置き、固めます。
10. 良く洗浄したスパチュラを用いて（ディスポーザブルプラグモールドの場合は付属のつめを用いて）アガロースサンプルを取り出します。 そしてLETバッファー（0.46M EDTA、pH8.0、0.01M Tris、pH7.5、7.5% β-mercoptoethanol）を入れた保存用バイヤルに入れます。1L LETバッファーは次のように調整されます。

0.5M EDTA	925ml
Trizma、pH7.5	1.5g
β-mercaptoethanol	75ml

11. サンプルを37℃で一晩（16～24時間）インキュベートします。
12. LETバッファーを除きアガロースプラグを3回（15分）0.05M EDTA、pH8.0で洗浄します。
    NDS（0.01Mtris、pH7.5、0.45M EDTA、pH8.0、1%laurylsarcosine、1mg/ml Proteinase K）をアガロースプラグに加えます。
13. 50℃で一晩インキュベートします。（16～24時間）
14. NDS バッファーを除きアガロースプラグを0.05M EDTA、pH8.0で15分室温で洗浄します。
15. 洗浄溶液を除き0.05M EDTA、pH8.0で洗浄し、同様の操作をもう一度行います。
16. 0.05M EDTA、pH8.0を加え室温で一晩置き、最終洗浄を行います。
17. アガロースプラグは0.05M EDTA、pH8.0、4℃で約一年保存できます。

酵母用のサンプル調整キットとしてCHEF酵母用DNAプラグキット（カタログ番号170-3593）をご用意しています。

1.3　哺乳細胞のDNAの調整

近年、パルスフィールド電気泳動によるヒトや哺乳動物のDNA解析が重要視されてきています。この技法を用いることにより数百から数千kbの長さのDNA鎖が分離できます。それらのDNAにはすべての遺伝情報が含まれます。哺乳動物の染色体はゲル中を電気によって泳動するには大きすぎるため、それらは制限酵素によって消化されて泳動し、プローブを用いたハイブリダイゼーションによって確認します。この章ではサンプル調整法、制限酵素による消化等の操作手順について記します。一般的にDNAはヒトの白血球等から調整します。また、一般的なサンプル調整法とパルスフィールド電気泳動条件は文献等の資料を参考にしています。
（英文取扱説明書参照）

哺乳細胞のサンプル調整プロトコール

次に示す方法はアガロース中の最終濃度10^7 細胞/mlのものを調整するものです。標準的なアガロースのスライスには50～100μg DNAを1レーン中にアプライします。

1．細胞をリン酸バッファーで回収します。
   A.　培養された組織細胞はかき集めたり、トリプシン処理をして回収した後遠心します。混合された培養液は直接遠心するか、短時間のトリプシン処理（0.25%in saline）によって溶解します。
   B.　白血球は全血から等張液で溶解するかFicoll（e.g. Sigma histopaque）で遠心分離します。はじめの血液量は5―50mlです。
   C.　組織ははさみ、またはかみそりで刻みホモジュナイザーで細胞をバラバラにします。組織の大きな固まりは沈殿させ、遠心機にかけ上部を回収します。
2．4℃下でPBS洗浄を2回します。
3．細胞数を数えPBSで$2x10^7$ 細胞/mlの濃度になるようにサスペンジョンします。細胞はヘモサイトメーター（e.g.Reichert inc.）でカウントすると便利です。
4．ペレットをくずすようにゆっくりとピペットでサスペンジョンし、37℃にします。
5．同量のPBSで調整した1%ローメルト調整用アガロースを加え45℃に冷まします。
   （note：アガロースは酵素処理可能なものを選択して下さい。）
6．ピペットマンや使い捨てのピペットを用いてディスポーザブルプラグモールドへ移します。その際、空気が入らないように注意して下さい。
7．アガロースを固めるために4℃、または氷上に10～20分ほど置きます。
8．サンプルブロックを3―5倍量の0.5M EDTA pH9、1% Sarcosyl. 0.5mg/mlプロテアーゼK（Boeringer-mannheim）に移します。
9．ゆっくり浸透しながら50℃で1～2日間処理をします。サンプルはこの溶液中に4℃下で保存可能です。

アガロース中でDNAの制限酵素処理をします。

1．サンプルを蒸留水で2度洗浄します。室温で50倍量のTE、3時間洗浄します。これを2回繰り返します。または、4℃で一晩ゆっくりと15または50mlのコニカルポリプロピレンチューブで回転浸とうさせます。
2．オプショナルとして；サンプルに残ったプロテアーゼKは1mM　PMSF（phenyl methyl sulfonyl flouride）の入ったTEで室温で2時間、2度洗浄することによって失活させることができます。その後TEで洗浄します。
3．サンプルは最終量に対して100-200μlの制限酵素で処理され、この量はプラグの厚さに依存します。サンプルには、10-20μl、10x反応バッファー（酵素にあったもの）を用い、ヌクレアーゼの入っていないBSAを0.1mg/mlになるように蒸留水と酵素を混合します。
4．アガロースブロックを1μg　DNAあたり2-10U酵素量として消化させます。適温にて4時間から一晩インキュベートします。酵素は2回加えます。一回目ははじめに入れます。次にインキュベーション中に加えます。これは酵素活性時間が短いためです。（酵素の取扱説明書等を参照して下さい。）
5．1ml、0.5M EDTAを加え反応を停止させます。5分間室温でインキュベートします。
6．サンプルからEDTAを除去します。アガロースブロックをウェルの前面（泳動方向）に密着するようにいれることが重要です。気泡が入っている場合は完全に取り除き、ウェルの隙間は0.8%ローメルトアガロースで埋めます。
7．ゲルは泳動前の30分ほどチャンバーに入れ泳動温度と平衡化します。

1. 4　サンププル調整におけるトラブルシューティング

　パルスフィールドゲルにおいて正確なバンドサイズに左右する要因は多数あります。それらの要因によるトラブルシューティングについて紹介します。

1.　ヌクレアーゼの混入

DNAサンプルは、サンプル調整や制限酵素処理の際にもヌクレアーゼによって壊れていきます。調整の際DNAの断片化は、調整後DNAは直接泳動され、小さなサイズを生じさせます。それぞれのサンプルのあとにヌクレアーゼによる切断がないかパルスフィードゲルで泳動をし、確認して下さい。ヌクレアーゼが混入している場合は、小さな断片を生じさせます。

2.　適切な泳動条件で泳動されていない

サイズマーカーはどのような条件で泳動されたかを示します。（特に電圧とスイッチタイム）新しく酵素処理されたサンプルは、様々な条件下で解析されなければなりません。一般的にまずはじめには、だいたいのサイズ範囲でそれにあった条件で泳動し、おおよそのバンドとそのサイズを見積もります。その後、より狭いレンジを用いることにより正確にフラグメントのサイズ決定をしていきます。

3.　制限酵素処理が不完全な場合

この場合サンプル中にタンパクが完全に取り除かれていない場合、またはDNAを精製する際に用いた物質（EDTA、プロテラーゼ、試薬など）が残っている場合に起こります。巨大DNAに使用される酵素の中にはメチレーションに敏感なものが多々あります。特定の部分がメチル化された部分を切断することは非常に困難です。DNAを他の組織から調整した場合（血液の代わりに繊維芽細胞等）組織特有のメチレーションパターンによって異なったサイズの断片を生じる場合があることも考慮する必要があります。

4.　サンプルの量が多い場合

パルスフィールドゲルにおいてサンプルDNA量に大きく影響します。DNA量が多いとバンドの移動度は小さくなり本来の大きさより大きなサイズを示します。

2．ゲルのキャスティング

ゲルを作成するにはキャスティングスタンドとエンドプレート、プラットホーム、コーム、コームホルダーを用います。

CHEF　Mapperシステムに付属するキャスティングスタンドのサイズは横14cm×縦13cmです。オプションとして横21cm×縦14cm、横14cm×縦21cmのものが使用可能です。

1．キャスティングスタンドの上にプラットホームを置き、横のねじの上にエンドプレートを乗せネジを締めます。コームホルダーにコームを取りつけます。コームの高さは底面から2mm程度浮かせてセッティングします。コームホルダーをキャスティングスタンドに立てます。
2．選択された泳動バッファー（TBEまたはTAE）に任意の濃度に調整し、バイオ・ラッドのアガロースを電子レンジまたはホットプレート等で溶かします。バッファーの組成は下に記します。

【10×TBE】	
108g	Tris base
55g	Boric acid
40ml	0.5M EDTA、pH8.0
mess up to 1L	

【50×TAE】	
242g	Tris base
57.1ml	gracial acetic acid
100ml	0.5M EDTA、pH8.0
mess up to 1L	

（プレミックスバッファーをご用意しております。）

3. ゲルは水平な場所で作成します。バイオ・ラッドではゲル作成用水平台（カタログ番号170-4046）を用いることをお勧めします。5mm厚のゲルを作成するには80-100ml（14×13cm）の溶解したアガロースをスタンダードサイズのキャスティングタンドに入れ30-45分室温にて固めます。ゲルが固まりましたらゆっくりとコームホルダーごとコームを抜き取ります。ゲルをキャスティングスタンドに納めたままの状態でサンプルプラグをアプライします。

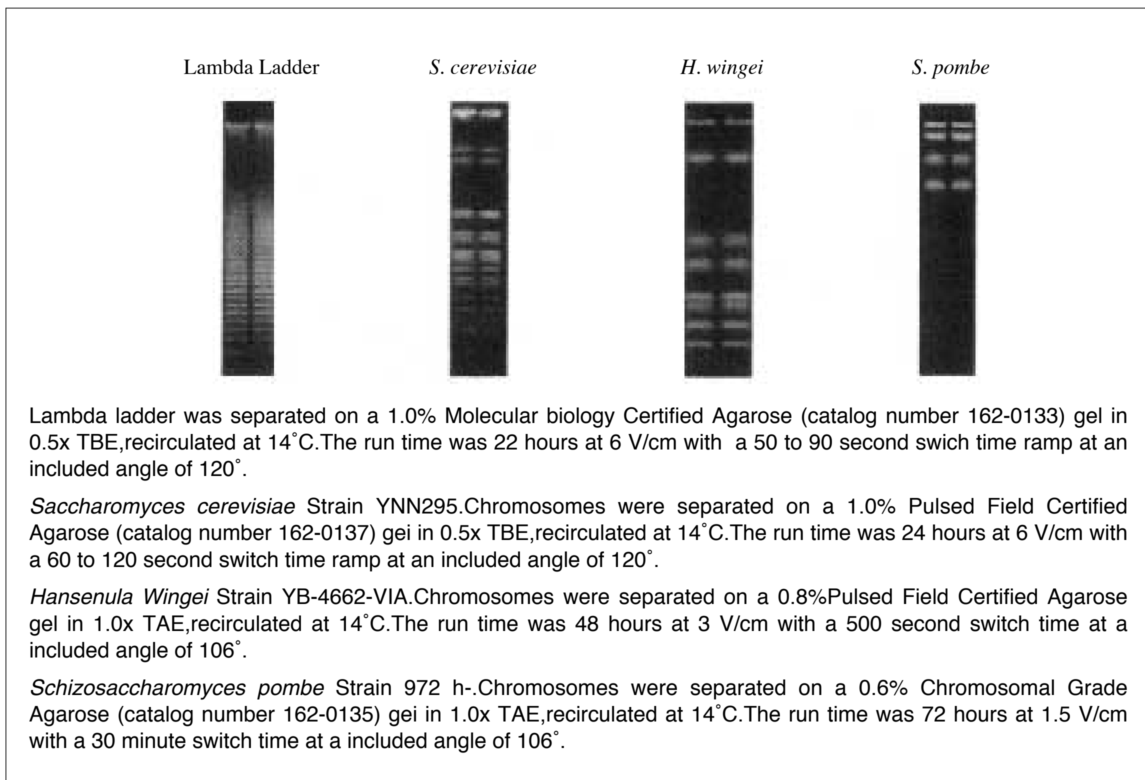
2. 1　サンププルのアプライ

サンプルを入れる方法の一つを説明します。

・DNAサンプルプラグは表面のなめらかなところに置きカミソリ、またはスパチュラを用いて切ります。サンプルはウェルの高さの90%以下になるような大きさに切ります。スパチュラを用いてサンプルプラグをウェルの前面に軽く押し付けます。それぞれのサンプルウェルに同濃度のローメルトアガロースで埋めます。アガロースが固まるまで10-15分置きます。
・液体状のサンプルは、ゲルを泳動槽にセットした後でアプライします。その際、液体サンプルがウェルから流れ出ていかないようにポンプを切っておきます。5-10分その状態で電気をかけ、サンプルがゲルの中に入ってからポンプのスイッチを入れます。（ポンプを停止させている間は、冷却装置の凍結を防ぐため、冷却装置の電源を切って下さい。）

2. 2 DNAサイズスタンダードについて

バイオ・ラッドでは泳動用スタンダードをそれぞれの未知サンプルの決定と泳動条件の検討にお勧めしています。



Lambda ladder was separated on a 1.0% Molecular biology Certified Agarose (catalog number 162-0133) gel in 0.5x TBE,recirculated at 14˚C.The run time was 22 hours at 6 V/cm with a 50 to 90 second swich time ramp at an included angle of 120˚.

Saccharomyces cerevisiae Strain YNN295.Chromosomes were separated on a 1.0% Pulsed Field Certified Agarose (catalog number 162-0137) gei in 0.5x TBE,recirculated at 14˚C.The run time was 24 hours at 6 V/cm with a 60 to 120 second switch time ramp at an included angle of 120˚.

Hansenula Wingei Strain YB-4662-VIA.Chromosomes were separated on a 0.8%Pulsed Field Certified Agarose gel in 1.0x TAE,recirculated at 14˚C.The run time was 48 hours at 3 V/cm with a 500 second switch time at a included angle of 106˚.

Schizosaccharomyces pombe Strain 972 h-.Chromosomes were separated on a 0.6% Chromosomal Grade Agarose (catalog number 162-0135) gei in 1.0x TAE,recirculated at 14˚C.The run time was 72 hours at 1.5 V/cm with a 30 minute switch time at a included angle of 106˚.

図1

3．電気泳動

　ゲルの乗ったプラットフォームをキャスティングスタンドから取り外します。プラットホームの裏に付着しているゲルをきれいに取り除いて下さい。ゲルを泳動槽のバッファーの中へ静かに入れます。ゲルをゲルフレームの中に納め、バッファーがゲル上2mm位まで覆っていることを確認します。バッファーを循環させ、もし必要であれば可変流速ポンプの流速つまみを用いて循環を調節して下さい。

　電気泳動はミニチラーを使用せずに泳動することも可能ですが、バッファー温度は30℃を超えないように注意して下さい。温度を一定に保つことは非常に重要な点です。バッファーは24時間毎に交換が必要です。発熱は電圧の大きさによって影響は受けますのでチラーを使用しない場合4.5V/cmより小さい電場で分離可能なDNAサイズでなければなりません。室温で泳動しますと14℃で泳動したものよりもバンドが広がってしまう傾向があります。

4．ゲルの取り出しと染色

　ゲルを取り出す際、泳動が完全に終了していることを確認して下さい。プラットホームからゲルを取り出し、0.5μg/mlのエチジウムブロマイド溶液に浸し20-30分染色します。（注意：エチジウムブロマイドは発癌物質です。染色の際には必ず手袋を着用して下さい。）
　1-3時間ゲルの脱色を行います。ゲルをトランスイルミネーター（254-360nm)の上に置きDNAを検出します。装置はポンプを止め、泳動槽のドレインのクランプを取りつけてチャンバー内のバッファーを廃棄します。使用済みのバッファーをぬいた後、廃棄用クランプをはずし、ddwを循環させて流路の洗浄をします。泳動槽を使用しない場合はチャンバーのふたを開けた状態にして乾燥させます。

note：泳動をしていない状態で泳動バッファーをチャンバーに入れたままにしておきますとふたの歪み等の原因となります。

5．泳動に影響するファクター

電気泳動による分離法

高分子DNAを電気泳動にて分離する際、考慮すべき要因がいくつかあります。その要因とはアガロース濃度、バッファー濃度、バッファー温度、スイッチ時間、電圧、パルス角度、泳動時間です。

アガロース濃度

アガロース濃度は分離されるDNAサイズの範囲によってバンドのシャープさ、引き締まりかたを決定します。3mbまでのサイズのDNAを分離するのには1%の濃度のアガロースが適当です。アガロースの濃度を1.2-1.5%にしますとバンドはシャープになりますがその分泳動時間が長くなります。特に大きなサイズのDNA（3mb以上）の場合は1%以下のゲル濃度（0.5-0.9%）を用います。しかし、一般的にゲル濃度が低い場合バンドはブロードになります。バイオ・ラッドでは低濃度のアガロースでも取り扱いやすいタイプをいくつかご用意しています。これらのアガロースの濃度範囲は0.5-0.8%で、サイズの大きなDNA（1mb以上）の分離時間短縮が可能となります。クロモゾーマルグレードアガロース（カタログ番号162-0133）がこれにあたります。

バッファー濃度と温度

パルスフィールド電気泳動でDNAの移動度はバッファーの温度に影響を受けます。バッファーの温度が上昇しますとDNAの移動度も大きくなりますがバンドのシャープさと分離能は悪くなります。バッファーは14℃で保つことがバンドのシャープさや長時間の泳動による熱を発散させるのに適当な温度といえます。そしてまた、バッファーの循環は温度むらをなくす点で役立ちます。高電圧（300V）で1日泳動しますとバッファーが劣化しますのでバッファーは24時間おきに交換して下さい。一般的なTBバッファーまたはTBEバッファーは0.5xの濃度でごく一般的にパルスフィールド電気泳動装置で用いられます。TAまたはTAEバッファーは1.0xの濃度でTB、TBEバッファーの代わりに用いることができます。その他のバッファー濃度は0.2x-1.0xの範囲内になります。図2には2つの異なるゲルで0.5xTBEと1.0xTAEそれぞれを用いて泳動したものです。これらは2つのバッファーによるDNAの分離の違いを示しています。

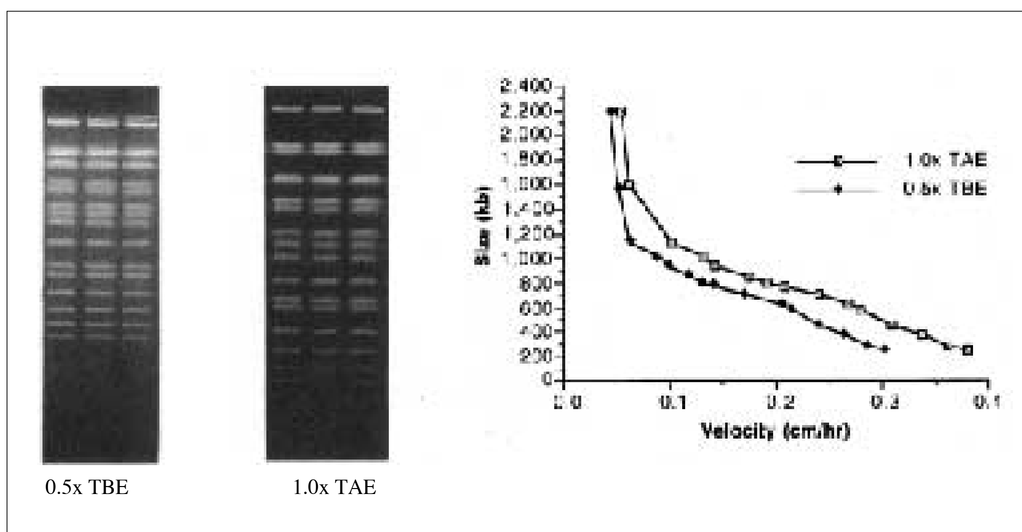


図2

スイッチ時間

DNA分子がアガロース中を移動する時間はパルスタイム、電圧、パルス角度と泳動時間に依存します。パルスフィールド電気泳動では、DNA分子はスイッチ時間と呼ばれる電場が保たれる時間が関係してきます。それぞれに電場がスイッチングし、DNAはゲル構造中の移動方向を変化させます。より大きな分子は方向を変化させるのにより長い時間がかかり、一回のパルスで移動できる距離も短くなります。そのため低分子のものよりもゆっくりと移動します。分離能はこの方向を変えるまでの時間であるパルスタイムに影響を受けます。それゆえにDNAを分離するDNAサイズが大きくなりますとパルスタイムも長くなります。いくつかの条件下では大きな分子が低分子のものより速い場合もあります。（Lai. E.,Personal Communication）

電圧（電場強度）

DNAは電圧または電場強度を上げるとその移動度もあがります。しかしながら電圧の上げすぎによる移動度の上昇はバンドのシャープさを失わせます。一般的にDNA分子量が大きくなりますと電場強度は下げます。高い電場（6v/cm）では大きいDNA（>3mb）はゲル中では分離できません。そしてまた、高分子量のDNAは高電圧下においてゲル中に入っていくことが出来ません。電圧は、経験的に選択します。これによって泳動時間と分離能が決定されます。

パルスアングル

CHEFシステムは2つのベクトルの内角の方向に向かって電場を形成し、分離します。2方向のベクトルによって1mbまでのDNA分子はその内角、鈍角に至るまで依存して分離されます。（Birren. Lai, Clarkand Hood, Science 241,1203-1205,1988）それには120°から94°に内角を狭くしますとDNAの移動度は大きくなり、大きなDNA（>1mb）は小さなDNA（<1mb）に比べ角度の変化により大きな影響を受けます。図3には*S.Cerevisiae*の内角による移動度の変化を示しています。内角を狭くしますと小さなDNAをひとまとめにし、分離が悪くなります。このような現象は、スイッチタイムを長くとった場合の小さいDNAの場合でも見られます。これによって1mb以上の巨大DNAを分離する際泳動時間の短縮をはかるため、内角を狭くする（<120°）ことをお勧めします。

電気泳動時間

電気泳動時間は、解析の際の分離度によって決定されます。移動度はスイッチタイム、電場強度、とパルスアングルに影響されます。泳動時間はDNA分子の分離度が悪い場合、適当な結果が得られるように延長します。

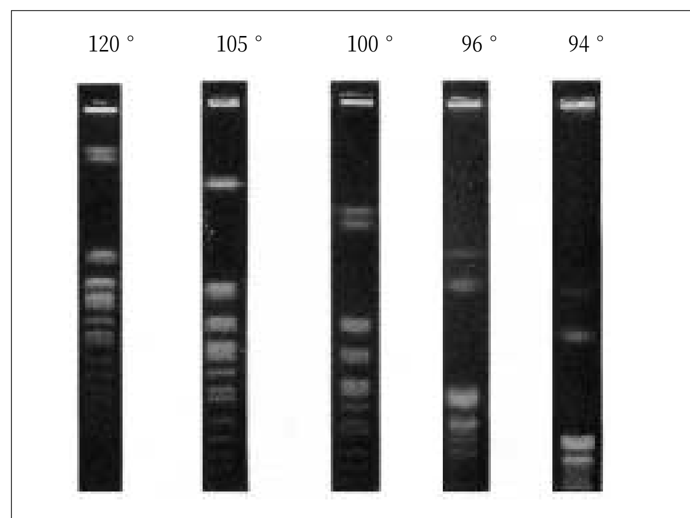


図3

6．巨大ＤＮＡのブロッティング

サザンブロッティング

パルスフィールド電気泳動は様々な生物の遺伝子のマッピングにおいて有効な手段です。微生物や哺乳類の遺伝子でサイズの制限されている断片などで、染色体レベルの遺伝子の位置を決定する場合CHEFで巨大DNAを分離し、メンブレンに転写、ハイブリダイゼーション解析によって検出することが可能です。CHEFで分離した巨大DNAをアガロースゲルからメンブレンに転写する方法について記します。

ゲルの前処理

20kbを超えるDNA断片を効果的に転写することは困難です。パルスフィールド電気泳動によって分離されたDNAはメンブレンに転写される前に切断します。DNAは酸（脱プリン）または紫外線照射によって切断できます。紫外線照射はパルスフィールドゲルを転写する前のニッキングに効果的な方法です。

手　順

つぎに示す方法は紫外線照射によるゲルの前処理のプロトコールとなります。良い結果を得るために、プロトコール通り厳密に行うことをお勧めします。

1. 1.0μg/mlのエチジウムブロマイド（EtBr）溶液で正確に30分ゲルを染色します。それぞれのゲルに新鮮なEtBr染色液を用い、ニッキング前に脱染色はしないで下さい。
2. 紫外線照射機を用いてUVを照射します。ゲルはUVによる影響を押さえるためにごく短時間で撮影します。（<1秒）撮影上必要な場合は脱染色をしてもかまいません。ニッキングしたDNAはアルカリ中か、中性の状態で転写します。
3. ゲルを0.4N NaOH、1.5M NaClに15分浸します。DNAを2Lの0.4N NaOH、1.5M NaClの転写バッファーを用いてZeta Probe GTナイロンメンブレン（カタログ番号162-0196）に転写します。
4. 下記に示すような下から上へのキャピラリートランスファーをセットします。
   A．Corning Pyrex ガラスディッシュ（28x18x4cm）
   B．ほぼ3cmの高さでガラスディッシュに入るくらいの大きさのPlexi glassかプラスチックの容器をサポート用に使用します。（e.g.エッペンドルフ黄色のピペットチッププラック）
   C．ガラスプレート（16x20cm）
   D．芯として2枚のブロッティングペーパー（18x30cm、S＆S GB002）
   E．アガロースゲル（上面が下）
   F．Zeta Probe GTナイロンメンブレンをゲルと同じ大きさに切りDWに浸します。
   G．ブロッティングペーパー2枚（18x15cm、S＆S GB002）
   H．10cm位の高さにペーパータオルを積み重ねます。

5. 24-48時間DNAを転写します。
6. 注意深くペーパータオルとブロッティングペーパーを取り除きます。メンブレンとゲルを一緒に取り除きます。ゲルとメンブレンを裏返しにし、ゲルを上にし、ウェルの場所に印をつけゲルの上部にも印をつけます。ウェルの位置は油性のマーカーペンでウェルの底を切り抜いて印をつけます。
7. 0.5M Tris pH7.0（中和バッファー）でメンブレンを5分間中和し、短時間2xSSCで洗浄します。転写されたDNAはその状態でトランスイルミネーターによってメンブレン上確認することができます。
8. 3MMやその他の吸水性のペーパーの上に置き、メンブレンを乾かし、ハイブリダイゼーションを行います。DNAをメンブレンへUVクロスリンクさせることはこのアルカリストランスファー法はお薦めできません。

補　足

1. この手順はゲルの厚さが6mmの時のものです。これより厚いゲルが用いられた場合、染色時間はEtBr染色液がゲルの内部へ浸透するのに余計に時間がかかため長くかかります。EtBrで染色されていないDNAはUVによってニッキングされることがないためゲルから転写されることはありません。
2. もし、UVの電源の出力が分からなく、UVメーターが使用できない場合、次のような方法でUVランプ電源を求めることが可能です。CHEF Mapper システムで8レーンに*S.Cerevisiae*のサイズマーカーを入れ、200-1000kb 分離用のスイッチタイムにて泳動します。泳動後、ゲルをEtBr溶解を用いて染色し、302nmのUV光でニッキングの影響の無い程度の時間でポラロイド（Polaroid type 667）で撮影します。この時カメラの露光時間を控えておいて下さい。控えるそれぞれの分離されたバンドが入るようにゲルを8つのストリップに切ります。ストリップを254nmで5、10、15、30、45、61、90、300秒の時間でそれぞれ照射します。254nmの光源が使用できない場合は302nmを用いてもかまいません。ただしその場合露光時間は約5倍長くなります。アルカリトランスファーによってゲルストリップは転写後染色されます。同じUV光源を用いてゲルストリップの写真を転写前に撮影した露光時間と同様にして撮影します。そして転写前のものと比較をします。DNAの転写率が80-90%の結果が得られた時間を選択します。転写が完全にされていたものは選択しないで下さい。なぜなら、ほぼ全てのDNAが転写されているものは効果的なハイブリダイゼーションをさせるには短く断片化されすぎている可能性があるためです。10秒よりも短時間の照射が要求される場合は302nmの電源を使用し、ゲルの写真をとり、ゲルの余分な部分を切り捨てます。一般的に10秒やそれ以下の露光時間は新しいトランスイルミネーターの使用時必要となります。UV出力は、時間によって低下し7年ほどではじめの状態の30%以下になります。
3. ゲルをNaOHに浸し前処理することは、転写した後のバックグラウンドを下げ、転写効率を上げます。

4. パルスフィールドは20xSSCを転写バッファーとしてスタンダードなアルカリブロッティングの後に中和し、メンブレンにブロッティングすることも可能です。ナイロンメンブレンにアルカリブロッティングすることはニトロセルロースに通常道りに転写するよりも効率も良く感度もあがります。アルカリ法の手順は簡単且つ時間も短く済みます。CHEF Mapperで分離されたDNAはバキュームブロッターによるナイロンメンブレンへの転写も可能です。モデル785バキュームブロッター（カタログ番号165-U5000）とNaOHバッファーで4時間のブロッティングで転写が可能です。
5. ゲルの裏側（ウェルの反対面）から転写されます。これは1%にのぼる高濃度ゲルの場合、ゲルの表面がなめらかになっていないためです。この様な表面はゲルからDNAが抜け出ることへの妨げとなります。裏面からの転写はなめらかな表面なのでメンブレンと密着し、効率もあがります。
6. 転写後にメンブレンを中和することはハイブリダイゼーション中のハイブリダイゼーションバッファーpHとの変化を防ぐためにも重要です。
7. DNAがメンブレン上でNaOH処理されている場合ナイロンメンブレンを必ずしもベーキングする必要はありません。
8. 転写効率を知るには中和バッファー中に1μg/ml EtBrとし、ゲルを染色します。そして転写後の写真と元のものを比較することによって得られます。



日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス事業部

本　　社	〒116-0014 東京都荒川区東日暮里5-7-18 コスモパークビル	☎ (03) 5811-6270	FAX. (03) 5811-6272
神奈川営業所	〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-7-3 フジビル	☎ (045) 476-0351	FAX. (045) 476-0350
つくば営業所	〒305-0031 つくば市吾妻1-15-1 筑波司法会館	☎ (0298) 52-0835	FAX. (0298) 52-0829
大阪営業所	〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11 第一生命ビル	☎ (06) 6308-6568	FAX. (06) 6308-3064
名古屋営業所	〒465-0093 名古屋市名東区一社3-121-1 MIDORIビル	☎ (052) 702-2358	FAX. (052) 702-2812
福岡営業所	〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-17-5 モリメンビル	☎ (092) 475-4856	FAX. (092) 475-4858
	※技術的お問い合わせは	☎ (03) 5811-6271	FAX. (03) 5811-6272

M3113-0105